苯甲酸、凝结芽孢杆菌和牛至油复合添加剂对大肠杆菌攻毒仔猪生长性能、抗氧化能力和空肠消化吸收功能的影响[1]

蒲俊宁[1] 陈代文[1] 田 刚[1] 何 军[1] 郑 萍[1] 毛湘冰[1] 虞 洁[1] 黄志清[1] 罗钧秋[1] 罗玉衡[1] 朱 玲[2] 余 冰[1*]

（1.四川农业大学动物营养研究所，动物抗病营养教育部重点实验室，雅安 625014；2. 四川农业大学动物医学院，动物生物技术中心，成都 610043）

摘 要：本试验旨在研究苯甲酸、凝结芽孢杆菌和牛至油复合添加剂对大肠杆菌攻毒仔猪生长性能、抗氧化能力、空肠黏膜二糖酶活性和养分转运载体 mRNA 表达的影响。20 头平均体重（7.64±0.46） kg 健康的（24±1）日龄“杜×长×大”断奶仔猪，随机分为 4 组，每组 5 个重复，每个重复 1 头猪。对照组（CON 组）和大肠杆菌组（ETEC 组）饲喂基础饲粮，抗生素组（AT 组）和复合添加剂组（ABO 组）分别饲喂在基础饲粮中添加抗生素（20 g/t 硫酸黏菌素+40 g/t 杆菌肽锌）和复合添加剂（3 000 g/t 苯甲酸+400 g/t 凝结芽孢杆菌+400 g/t 牛至油）的试验饲粮。试验第 22 天，ETEC、AT 和 ABO 组仔猪灌服含 3×10^{11} CFU 大肠杆菌的培养液，CON 组仔猪灌服相同剂量的无菌培养液。试验期共 26 d。结果表明：与 CON 组相比，ETEC 组仔猪腹泻率和腹泻指数显著提高（$P<0.05$），血清和空肠黏膜丙二醛（MDA）含量显著提高（$P<0.05$），血清总抗氧化能力（T-AOC）和总超氧化物歧化酶（T-SOD）活性以及空肠黏膜钠-葡萄糖共转运载体 1（*SGLT*1）mRNA 表达水平显著降低（$P<0.05$），有降低空肠黏膜 T-AOC 和 T-SOD 活性的趋势（$P<0.10$）。与 ETEC 组相比，ABO 组仔猪平均日增重（ADG）显著提高（$P<0.05$），仔猪料重比（F/G）显著降低（$P<0.05$），仔猪腹泻率和腹泻指数显著降低（$P<0.05$），血清和空肠黏膜 MDA 含量显著降低（$P<0.05$），血清和空肠黏膜 T-AOC 和 T-SOD 活性显著提高（$P<0.05$），空肠黏膜 *SGLT*1 和寡肽转运蛋白 1（*PepT*1）mRNA 表达水平显著提高（$P<0.05$）。此外，与 AT 组相比，ABO 组仔猪腹泻指数显著降低（$P<0.05$），血清 T-AOC 显著提高（$P<0.05$）。综上所述，饲粮添加苯甲酸、凝结芽孢杆菌和牛至油复合添加剂可显著缓解大肠杆菌攻毒诱导的仔猪腹泻，提高仔猪抗氧化能力，改善仔猪的生长性能和肠道消化吸收功能。

关键词：苯甲酸；凝结芽孢杆菌；牛至油；生长性能；抗氧化能力；断奶仔猪

中图分类号：S828

收稿日期：2018-03-06

基金项目：国家科技支撑计划项目（2014BAD13B01）；四川省科技支撑计划项目（2014NZ0043）

作者简介：蒲俊宁（1990-），男，四川南充人，博士研究生，从事猪营养研究。E-mail: 1135422733@qq.com

*通信作者：余 冰，教授，博士生导师，E-mail: ybingtian@163.com

为了获得更高的经济效益，仔猪早期断奶已成为现代养猪生产常用的重要技术之一。然而，早期断奶仔猪肠道发育不完善，易受饲粮、环境和心理等因素的影响，进而易遭受病原微生物的侵害引起肠道结构和功能的损伤，导致仔猪腹泻和死亡[1]。产肠毒素大肠杆菌（enterotoxigenic *Escherichia coli*, ETEC）是导致仔猪腹泻和死亡的主要病源性致病因子之一[2-3]。已有研究表明，ETEC 感染会引起幼龄动物抗氧化能力降低，尤其是肠道细胞抗氧化酶活性的降低，促进脂质过氧化反应，从而破坏肠黏膜的完整性及功能，且这一过程可能是 ETEC 导致仔猪腹泻的重要机制之一[4-5]。饲粮中添加饲用抗生素是预防断奶仔猪腹泻的一种常用技术手段，但是抗生素长期大量使用会造成动物机体免疫力下降、细菌耐药性增强以及抗生素残留等诸多问题，严重危害人类健康[6-7]。因此，寻找一种安全、高效的抗生素替代品或替代技术显得十分重要。

前人研究发现，苯甲酸、凝结芽孢杆菌和牛至油均具有较强的抗氧化能力，并对多种应激源诱导的氧化损伤具有显著缓解作用，具有替代抗生素的可能性。Chang 等[8]研究发现，苯甲酸含有羧基能够清除机体内自由基，中断自由基链式反应，抑制脂质过氧化，缓解氧化损伤。Kodali 等[9]研究表明，凝结芽孢杆菌可以清除机体产生的活性氧（ROS），抑制产生 ROS 的微生物，增强机体抗氧化能力。牛至油是从植物牛至中提取的一种挥发油，主要有效成分是香芹酚和百里香酚[10]。百里香酚含有苯酚羟基基团，可为脂肪氧化第一步产生的过氧化氢基团提供氢供体，延缓氢过氧化物的形成[11]。此外，牛至油进入动物机体后可激活抗氧化酶系统，提高抗氧化酶活性，增强机体清除氧自由基的能力，从而提高机体抗氧化能力[12]。但是，生产中发现苯甲酸、凝结芽孢杆菌和牛至油单独添加作用有限，且结果变异较大。近年来，有机酸，益生菌和精油在动物饲粮中组合添加的“协同”和“加性”效应已引起广泛关注[13-14]。但是，尚缺乏关于苯甲酸、凝结芽孢杆菌和牛至油在饲粮中组合添加缓解大肠杆菌攻毒诱导仔猪氧化应激的报道。因此，本研究根据苯甲酸、凝结芽孢杆菌和牛至油具有的抗氧化功能，将它们组合添加，初步考察其对大肠杆菌攻毒条件下仔猪生长性能、抗氧化能力、空肠黏膜二糖酶活性和养分转运载体 mRNA 表达的影响，以期为 3 种添加剂的合理使用积累资料，也可为仔猪饲用抗生素替代品的研究提供参考。

1　材料与方法

1.1　试验材料

苯甲酸：帝斯曼（中国）有限公司生产，纯度 99.5%，推荐剂量 3 000~5 000 g/t；凝结芽孢杆菌：昆明三正集团惠赠，含量 5×10^9 CFU/g，推荐剂量 200~400 g/t；牛至油：珠海建明工业有限公司惠赠，主要有效成分香芹酚和百里香酚含量分别大于 2.2%和 1.1%，推荐剂

量 300~500 g/t。

1.2　试验设计

选取 20 头平均体重（7.64±0.46） kg 健康的（24±1）日龄“杜×长×大”断奶仔猪，按体重相近原则，随机分为对照组（CON 组）、大肠杆菌组（ETEC 组）、抗生素组（AT 组）和复合添加剂组（ABO 组）4 个组，每组 5 个重复，每个重复 1 头猪。CON 和 ETEC 组饲喂基础饲粮，AT 和 ABO 组分别饲喂在基础饲粮中添加抗生素（20 g/t 硫酸黏菌素+40 g/t 杆菌肽锌）和复合添加剂（3 000 g/t 苯甲酸+400 g/t 凝结芽孢杆菌+400 g/t 牛至油）的试验饲粮。试验第 22 天早上，ETEC、AT 和 ABO 组仔猪每头灌服含 3×10^{11} CFU 大肠杆菌的培养液，CON 组仔猪灌服相同剂量的无菌培养液，试验期共 26 d。

1.3　试验饲粮

基础饲粮为玉米-豆粕型饲粮，参照 NRC（2012）7~25 kg 断奶仔猪营养需要配制而成，其组成及营养水平见表 1。试验饲粮由相应的添加剂产品等量替代基础饲粮中的玉米构成。

表 1　基础饲粮组成及营养水平（风干基础）

Table 1　Composition and nutrient levels of the basal diet (air-dry basis)　　%

项目 Items	含量 Content
原料 Ingredients	
玉米 Maize	29.80
膨化玉米 Extruded maize	29.85
鱼粉 Fish meal	4.50
乳清粉 Whey powder	6.00
蔗糖 Sucrose	3.00
豆粕 Soybean meal	10.00
大豆浓缩蛋白 Soybean protein concentrate	6.40
膨化大豆 Extruded soybean	6.70
大豆油 Soybean oil	1.70
L-赖氨酸盐酸盐 *L*-Lys•HCl	0.26
L-苏氨酸 *L*-Thr	0.02
DL-蛋氨酸 *DL*-Met	0.09
L-色氨酸 *L*-Try	0.01

氯化胆碱 Choline chloride	0.15
食盐 NaCl	0.20
碳酸钙 $CaCO_3$	0.60
磷酸氢钙 $CaHPO_4$	0.37
维生素预混料 Vitamin premix[1)]	0.05
矿物质预混料 Mineral premix[2)]	0.30
合计 Total	100.00
营养水平 Nutrient levels[3)]	
消化能 DE/（MJ/kg）	14.72
粗蛋白质 CP	19.13
钙 Ca	0.75
总磷 TP	0.56
有效磷 AP	0.37
可消化赖氨酸 DLys	1.30
可消化蛋氨酸 DMet	0.41
可消化苏氨酸 DThr	0.79
可消化色氨酸 DTrp	0.22

[1)]维生素预混料可为每千克饲粮提供 Vitamin premix provided the following per kg of the diet：VA 9 000 IU，VD_3 3 000 IU，VE 20.0 IU，VK_3 3.0 mg，VB_1 1.5 mg，VB_2 4.0 mg，VB_6 3.0 mg，VB_{12} 0.02 mg，烟酸 nicotinic acid 30.0 mg，泛酸 pantothenic acid 15.0 mg，叶酸 folic acid 0.75 mg，生物素 biotin 0.1 mg。

[2)]矿物质预混料可为每千克饲粮提供 Mineral premix provided the following per kg of the diet：Fe 100 mg，Cu 150 mg，Mn 20 mg，Zn 100 mg，I 0.3 mg，Se 0.3 mg。

[3)]营养水平为计算值。Nutrient levels were calculated values.

1.4 饲养管理

试验在四川农业大学动物营养研究所实验基地进行。试验期间，仔猪自由饮水，每日饲喂 4 次(08:00、12:00、16:00、20:00)，少喂勤添，饲喂量以猪只吃饱后料槽内略有剩余为度。圈舍温度控制在 25~28 ℃，相对湿度 60%~70%。试验仔猪按是否用大肠杆菌攻毒处理分别饲养于 2 间代谢室，防止交叉感染。

1.5 大肠杆菌培养与感染

本试验所用的大肠杆菌菌株为 ETEC，由四川农业大学动物医学院生物技术中心重点实

验室提供，其血清型包括 O149、K88 和 K91。在试验第 22 天早上仔猪空腹称重后进行攻毒，攻毒组每头仔猪通过胃导管灌服 3×10^{11} CFU（浓度为 1×10^{9} CFU/mL）大肠杆菌培养液，未攻毒组仔猪灌服同等剂量的无菌培养液。

1.6　样品采集与处理

试验第 27 天早上仔猪空腹称重后，前腔静脉采血 20 mL，置于普通离心管，室温下放置 30 min，3 500 r/min 离心 10 min，分离血清，置于-20 ℃保存，待测血清抗氧化指标。采血后，所有仔猪麻醉致死后迅速打开腹腔分离肠道，将空肠从其肠系膜处取下后于冰上取样。于空肠 1/2 处截取 20 cm 左右肠段，纵向剖开，用预冷生理盐水轻轻冲洗除去肠壁上的内容物，放置于滤纸上吸干水分，用载玻片沿同一方向轻轻刮取黏膜，装入 EP 管中，用锡箔纸包好，液氮速冻后-80 ℃保存待测。

1.7　测定指标与方法

1.7.1　生长性能

以重复为单位，于试验开始后第 1 和 27 天早晨对试验猪进行空腹称重，记录每日采食量，计算仔猪平均日采食量（average daily feed intake，ADFI）、平均日增重（average daily gain，ADG）和料重比（feed/gain，F/G）。

1.7.2　腹泻指标

大肠杆菌攻毒后，每天观察并记录每个组仔猪腹泻状况，用于腹泻指数和腹泻率计算。粪便评分标准见表 2。当粪便评分大于或等于 2 时定义为仔猪腹泻。腹泻率和平均腹泻指数的计算，分别参照 Yuan 等[15]和廖波[16]。计算公式如下：

腹泻率（%）=[试验期腹泻头次/(试验仔猪头数×试验天数)]×100；

腹泻指数=总腹泻评分/(试验仔猪头数×试验天数)。

表 2　腹泻评判标准

Table 2　Standard of diarrhea score

腹泻程度 Diarrhea degree	粪便外观 Excrement shape	腹泻评分 Diarrhea score
正常 Normal	坚硬的条形或粒状	0
轻度 Light	软便、能成形	1
中度 Middle	浆糊状、不成形	2
重度 Severity	液状、粪水分离	3

1.7.3　血清和肠道抗氧化能力

血清和肠道中总抗氧化能力（total antioxidant capability，T-AOC），谷胱甘肽过氧化物

酶（glutathione peroxidase，GSH-Px）和总超氧化物歧化酶（total superoxide dismutase，T-SOD）活性及丙二醛（malondialdehyde，MDA）含量采用南京建成生物工程研究所试剂盒进行测定，操作均按说明书进行。空肠黏膜匀浆操作如下：用精密电子天平称取各组空肠黏膜 1 g 左右，按重量/体积=1:9 的比例加入提前预冷的生理盐水，置冰上匀浆后，匀浆液于冷冻离心机中按不同指标要求转速离心，取上清液用于 T-AOC，GSH-Px、T-SOD 活性及 MDA 含量测定。

1.7.4　空肠黏膜二糖酶活性

采用南京建成生物工程研究所试剂盒进行空肠黏膜蔗糖酶和麦芽糖酶活性测定。样品测定之前需进行匀浆预处理，称取 0.5 g 空肠黏膜样品，按重量/体积=1/9 的比例加入预冷的生理盐水，冰浴条件下进行匀浆，匀浆液于 4 ℃冷冻离心机中 3 500 r/min 离心 10 min，取上清液用于膜蔗糖酶和麦芽糖酶活性测定。

1.7.5　空肠黏膜养分转运载体 mRNA 表达水平

采用实时荧光定量 PCR（RT-PCR）技术检测空肠黏膜钠-葡萄糖共转运载体 1（sodium-glucose cotransporter 1, *SGLT*1）、葡萄糖转运蛋白 2（glucose transporter type 2, *GLUT*2）和寡肽转运蛋白 1（oligopeptide transporter 1, *PepT*1）mRNA 表达水平。

空肠黏膜总 RNA 提取按照试剂盒(Trizol Reagent，TaKaRa，日本)操作说明进行，RNA 浓度采用核酸蛋白检测仪(Beckman Du-800，CA，美国)检测。A260/A280 表示的是 RNA 的纯度，该比值位于 1.8~2.0 之间表明 RNA 纯度较好。cDNA 合成采用逆转录试剂盒(PrimeScript^{TM} reagent kit，TaKaRa，日本)进行，具体操作步骤参照说明书进行，反应结束后-20 ℃保存备用。利用 NCBI 搜索目的基因片段，运用 Primer 5、Oligo 6.0 进行引物设计，由大连宝生生物公司合成，引物序列及退火温度见表 3。用实时定量 PCR 仪(ABI7900HT Real-Time PCR System，ABI，美国)进行测定，RT-PCR 反应体系为 10 µL：5 µL SYBR Premix Ex Taq^{TM} Ⅱ(2×) (TaKaRa，日本)，0.4 µL 上游引物，0.4 µL 下游引物，3.2 µL 双蒸水，1 µL cDNA 模板。PCR 扩增条件为：95 ℃ 30 s，95 ℃ 5 s，适宜的退火温度 30 s，共 40 个循环，95 ℃ 10 s。溶解曲线：55~95 ℃，温度以 0.5 ℃/s 速率提升。以甘油醛-3-磷酸脱氢酶（glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase，*GAPDH*）作为内参基因，相对荧光定量计算方法采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算[17]。

表 3　RT-PCR 引物序列及退火温度

Table 3　Primer sequences and annealed temperature for real-time PCR

项目 Items	引物序列 Primer sequence (5'–3')	退火温度 Anneal temperature/℃	引物长度 Product length/bp	GenBank 登录号 GenBank accession No.
甘油醛-3-磷酸脱氢酶 *GAPDH*	上游：TGAAGGTCGGAGTGAACGGAT 下游：CACTTTGCCAGAGTTAAAAGCA	55.7	114	NM_001206359.1
钠-葡萄糖共转运载体 1 *SGLT*1	上游：AGAAGGGCCCCAAAATGACC 下游：TGTTCACTACTGTCCGCCAC	59	96	NM_001164021.1
葡萄糖转运蛋白 2 *GLUT*2	上游：TGGAATCAGCCAACCTGTTT 下游: ACAAGTCCCACCGACATGA	55.7	156	NM_001097417.1
寡肽转运蛋白 1 *PepT*1	上游: GCCAAAGTCGTCAAGTGC 下游: GGTCAAACAAAGCCCAGA	63.3	100	NM214347

1.8　数据处理与统计分析

试验数据先用 Excel 2013 进行初步整理，然后采用 SPSS 17.0 统计软件的独立 *t* 检验程序检测 CON 组和 ETEC 组之间的差异；大肠杆菌攻毒组（ETEC、AT 和 ABO 组）数据先进行单因素方差分析，然后用 Duncan 氏法进行多重比较。所有数据均以"平均值和总体标准误"表示，以 $P<0.05$ 为差异显著，$0.05 \leq P \leq 0.10$ 为有趋势。

2　结　果

2.1　复合添加剂对大肠杆菌攻毒仔猪生长性能的影响

由表 4 可知，试验全期各组仔猪 ADFI 无显著差异（$P>0.05$）。与 CON 组相比，ETEC 组仔猪 ADG 降低了 9.91%>0.05)，F/G 增加了 5.11%($P>0.05$)。与 ETEC 组相比，ABO 组仔猪 ADG 显著提高（$P<0.05$），F/G 显著降低（$P<0.05$）。与 AT 组相比，ABO 组仔猪 ADG 提高了 17.21% ($P>0.05$)，F/G 降低了 5.29% ($P>0.05$)。

表 4　复合添加剂对大肠杆菌攻毒仔猪生长性能的影响

Table 4　Effects of compound additive on growth performance of piglets challenged with *Escherichia coli*

项目 Items	组别 Groups CON	ETEC	AT	ABO	SEM	P 值 P-value P1	P2
平均日采食量 ADFI/g	436.59	421.94	459.74	509.90	17.07	0.719	0.233
平均日增重 ADG/g	253.46	228.34[a]	272.69[ab]	319.62[b]	13.88	0.410	0.071
料重比 F/G	1.76	1.85[b]	1.70[ab]	1.61[a]	0.04	0.429	0.093

#表示 ETEC 与对照组相比差异显著（*P*<0.05）；a、b、c 表示大肠杆菌攻毒组（ETEC、AT 和 ABO 组）间的差异，同行数据肩标不同小写字母表示差异显著（*P*<0.05）。*P*1 表示 ETEC 组与对照组间比较的 *P* 值，*P2* 表示大肠杆菌攻毒组（ETEC、AT 和 ABO 组）间比较的 *P* 值。下表同。

mean significantly different between ETEC and CON groups (*P*<0.05). a, b and c indicate the difference among ETEC-challenged groups (ETEC, AT and ABO groups), values in the same row with different small letter superscripts mean significant difference (*P*<0.05). *P*1 mean the *P*-value of CON group compared with ETEC group, *P2* mean the *P*-value compared among ETEC-challenged groups (ETEC, AT and ABO groups). The same as below.

2.2　复合添加剂对大肠杆菌攻毒仔猪腹泻的影响

由表 5 可知，在试验 22~26 天（攻毒后），与 CON 组相比，ETEC 组仔猪腹泻率和腹泻指数显著提高(*P*<0.05)。与 ETEC 组相比，ABO 组仔猪腹泻率和腹泻指数显著降低(*P*<0.05)，AT 组腹泻率和腹泻指数一定程度降低(*P*>0.05)。与 AT 组相比，ABO 组仔猪腹泻指数显著降低（*P*<0.05）。

表 5　复合添加剂对大肠杆菌攻毒仔猪腹泻的影响

Table 5　Effects of compound additive on diarrhea of piglets challenged with *Escherichia coli*

项目 Items	组别 Groups CON	ETEC	AT	ABO	SEM	P 值 P-value P1	P2
腹泻率 Diarrhea rate/%	0.00	44.00[#b]	24.00[ab]	4.00[a]	4.79	<0.001	0.004
腹泻指数 Diarrhea index	0.00	0.88[#b]	0.52[b]	0.08[a]	0.09	<0.001	0.006

2.3　复合添加剂对大肠杆菌攻毒仔猪血清和空肠黏膜抗氧化能力的影响

由表 6 可知，与 CON 组相比，ETEC 组仔猪血清和空肠黏膜 MDA 含量显著提高（*P*<0.05），血清 T-AOC 和 T-SOD 活性显著降低(*P*<0.05)，有降低空肠黏膜 T-AOC 和 T-SOD 活性趋势（*P*<0.10）。与 ETEC 组相比，ABO 组仔猪血清和空肠黏膜 T-AOC 和 T-SOD 活性显著升高（*P*<0.05），血清和空肠黏膜 MDA 含量显著降低（*P*<0.05）；AT 组血清 T-AOC 活

性显著升高（$P<0.05$）。与 AT 组相比，ABO 组仔猪血清 T-AOC 活性显著提高（$P<0.05$）。各组仔猪血清和空肠黏膜 GSH-Px 活性均无显著差异（$P>0.05$）。

表 6　复合添加剂对大肠杆菌攻毒仔猪血清和空肠黏膜抗氧化能力的影响

Table 6　Effects of compound additive on antioxidant capacity in serum and jejunal mucosa of piglets challenged with *Escherichia coli*

项目	组别 Groups				SEM	*P* 值 *P*-value	
Items	CON	ETEC	AT	ABO		*P*1	*P*2
血清 Serum							
总抗氧化能力 T-AOC/(U/mL)	0.96	0.41[#a]	0.75[b]	0.96[c]	0.07	0.006	<0.001
谷胱甘肽过氧化物酶 GSH-Px/(U/mL)	444.45	421.02	436.71	441.08	7.14	0.408	0.443
总超氧化物歧化酶 T-SOD/(U/mL)	97.43	91.40[#a]	94.43[ab]	97.02[b]	0.94	0.028	0.100
丙二醛 MDA/(nmol/mL)	2.96	3.76[#b]	3.29[ab]	3.01[a]	0.12	0.004	0.104
空肠黏膜 Jejunal mucosa							
总抗氧化能力 T-AOC/(U/mg prot)	0.40	0.24[a]	0.35[ab]	0.41[b]	0.03	0.070	0.083
谷胱甘肽过氧化物酶 GSH-Px/(U/mg prot)	18.48	15.27	17.74	18.93	1.63	0.508	0.739
总超氧化物歧化酶 T-SOD/(U/mg prot)	59.20	50.70[a]	55.65[ab]	59.72[b]	1.49	0.069	0.051
丙二醛 MDA/(nmol/mg prot)	0.32	0.60[#b]	0.39[ab]	0.32[a]	0.04	0.050	0.096

2.4　复合添加剂对大肠杆菌攻毒仔猪空肠黏膜二糖酶活性的影响

由表 7 可知，各组仔猪空肠黏膜麦芽糖酶和蔗糖酶活性差异均不显著（$P>0.05$）。与 CON 组相比，ETEC 组仔猪空肠黏膜麦芽糖酶和蔗糖酶活性分别降低了 21.18%和 9.46%；与 ETEC 组相比，ABO 组仔猪空肠黏膜麦芽糖酶和蔗糖酶活性分别提高了 26.17%和 8.59%。

表 7　复合添加剂对大肠杆菌攻毒仔猪空肠黏膜二糖酶活性的影响

Table 7 Effects of compound additive on disaccharidase activities in jejunal mucosa of piglets challenged with *Escherichia coli* U/mg prot

项目 Items	组别 Groups CON	ETEC	AT	ABO	SEM	*P* 值 *P*-value *P*1	*P*2
麦芽糖酶 Maltase	187.79	148.01	173.53	186.74	11.24	0.338	0.541
蔗糖酶 Sucrase	153.98	139.42	134.96	151.40	13.74	0.796	0.877

2.5 复合添加剂对大肠杆菌攻毒仔猪空肠黏膜养分转运载体 mRNA 表达的影响

由表 8 可知，与 CON 组相比，ETEC 组仔猪空肠黏膜 *SGLT*1 mRNA 表达水平显著降低（$P<0.05$）。与 ETEC 组相比，ABO 组仔猪空肠黏膜 *SGLT*1 和 *PepT*1 mRNA 表达水平显著提高（$P<0.05$），AT 组空肠黏膜 *PepT*1 mRNA 表达水平显著提高（$P<0.05$）。然而，各组仔猪空肠黏膜 *GLUT*2 mRNA 表达水平均无显著差异（$P>0.05$）。

表 8 复合添加剂对大肠杆菌攻毒仔猪空肠黏膜养分转运载体 mRNA 表达的影响

Table 8 Effects of compound additive on nutrient transporter mRNA expression in jejunal mucosa of piglets challenged with *Escherichia coli*

项目 Items	组别 Groups CON	ETEC	AT	ABO	SEM	*P* 值 *P*-value *P*1	*P*2
钠-葡萄糖共转运载体 1 *SGLT*1	1.00	$0.58^{\#a}$	1.21^{ab}	1.39^{b}	0.12	0.045	0.047
葡萄糖转运蛋白 2 *GLUT*2	1.00	0.70	1.54	1.59	0.14	0.123	0.076
寡肽转运蛋白 1 *PepT*1	1.00	0.59^{a}	1.12^{b}	1.27^{b}	0.10	0.112	0.024

3 讨 论

3.1 动物攻毒模型的构建

本试验利用大肠杆菌攻毒建立仔猪腹泻模型发现，大肠杆菌攻毒导致仔猪 ADG 降低 9.91%，F/G 增加 5.11%，结果与前人报道结果[18]基本一致。其可能原因，一方面与大肠杆菌攻毒后营养物质从促进机体生长转移到支持机体免疫应答有关，另一方面与肠道功能障碍以及腹泻导致对营养物质的消化吸收能力降低有关[19-20]。前人研究表明，大肠杆菌诱导的肠道抗氧化能力降低可能是其导致仔猪腹泻的重要机制[21]。本研究也发现，大肠杆菌攻毒显著提高了仔猪血清和空肠黏膜 MDA 含量，降低了血清 T-AOC 和 T-SOD 活性，有降低空肠黏膜 T-AOC 和 T-SOD 活性的趋势，结果与前人研究报道[4,22]一致。因此，我们推测从饲粮途径增强仔猪的抗氧化能力可能是缓解仔猪大肠杆菌腹泻的有效措施之一。

3.2 复合添加剂对大肠杆菌攻毒仔猪生长性能和腹泻的影响

前人研究发现，苯甲酸、凝结芽孢杆菌和牛至油作为饲料添加剂，具有改善畜禽生长性能和增强疾病抵抗力的效应。Papatsiros 等[23]研究发现，饲粮中添加苯甲酸和蜡样芽胞杆菌混合物可显著提高断奶仔猪 ADG，降低 F/G 和腹泻率。Hui 等[24]研究发现，断奶仔猪饲粮中添加 2 000 mg/kg 苯甲酸和 100 mg/kg 百里香酚显著改善了仔猪生长性能，降低了腹泻指数。李洁云等[25]在研究酸化剂、益生菌、精油和酶制剂共同组合添加对断奶仔猪生长性能影响时发现，与 AT 组相比，该 4 种产品同时添加显著提高了断奶仔猪 ADG，降低了 F/G 和腹泻率。本研究也发现，苯甲酸、凝结芽孢杆菌和牛至油组合添加显著改善了大肠杆菌攻毒仔猪 ADG，降低了 F/G、腹泻率和腹泻指数，且作用效果优于 AT 组。其原因可能与 3 种添加剂的抗氧化作用有关。

3.3　复合添加剂对大肠杆菌攻毒仔猪抗氧化能力的影响

众所周知，为了抵抗氧化损伤，体内存在的酶类抗氧化系统和非酶类抗氧化系统相互作用共同维持机体自由基平衡，其中 T-AOC、T-SOD、GSH-Px 是酶类抗氧化系统的重要组成部分[26]。MDA 则是脂质过氧化所产生的稳定终产物，其含量常常用来反映机体内的脂质过氧化程度和细胞损伤程度[27]。已有研究发现，苯甲酸、凝结芽孢杆菌和牛至油具有很强的抗氧化能力，可以缓解病理条件诱导的氧化损伤。刁慧[28]研究发现，断奶仔猪饲粮中添加 0.5% 苯甲酸能够显著降低仔猪血清 MDA 含量。唐晓溪[29]在小鼠饲粮中添加植物精油可提高肝脏 GSH-Px 活性及心脏过氧化氢酶（CAT）和超氧化物歧化酶（SOD）活性，降低肝脏、肺脏 MDA 含量。本研究发现，饲粮添加复合添加剂显著缓解了大肠杆菌攻毒引起的血清和空肠黏膜 T-AOC 和 T-SOD 活性降低及 MDA 含量升高，且作用效果优于 AT 组。结果表明，苯甲酸、凝结芽孢杆菌和牛至油组合添加可提高机体和肠道的抗氧化能力，缓解大肠杆菌攻毒诱导的氧化损伤。

3.4　复合添加剂对大肠杆菌攻毒仔猪空肠消化吸收功能的影响

小肠是机体食物消化吸收的最主要部位，肠黏膜上的二糖酶对碳水化合物的吸收起着重要作用[30]。Jang 等[31]研究发现，肉鸡饲粮中添加 50 mg/kg 的植物精油能显著提高胰蛋白酶、α-淀粉酶和麦芽糖酶的活性。郭娟[32]研究发现，地衣芽袍杆菌能够显著提高小肠黏膜二糖酶活性。本研究发现，大肠杆菌攻毒使仔猪空肠黏膜麦芽糖酶和蔗糖酶活性分别降低了 21.18% 和 9.46%，而饲粮添加复合添加剂则明显抑制大肠杆菌诱导的麦芽糖酶和蔗糖酶活性的下降。与此同时，在动物肠道黏膜中存在大量的养分转运载体，其表达量的高低反映出肠道对营养物质的吸收转运能力。GLUT2 和 SGLT1 是介导葡萄糖吸收的主要载体[33]。PepT1 在小肠黏膜中主要运输来自食物蛋白质消化分解产生的二肽和三肽[34]。本研究发现，大肠杆菌攻

毒显著降低了仔猪空肠黏膜 *SGLT*1 mRNA 表达水平，而饲粮添加复合添加剂显著抑制了大肠杆菌诱导的 *SGLT*1 和 *PepT*1 mRNA 表达水平的降低。结果表明，饲粮添加复合添加剂可显著改善大肠杆菌攻毒仔猪肠道养分消化吸收能力，这可能与苯甲酸、凝结芽孢杆菌和牛至油组合添加可提高仔猪抗氧化能力，缓解大肠杆菌攻毒诱导的氧化损伤，进而改善肠道屏障结构和功能完整性有关。

4 结　论

饲粮添加苯甲酸、凝结芽孢杆菌和牛至油复合添加剂可显著抑制大肠杆菌诱导的仔猪腹泻和氧化损伤，提高仔猪抗氧化能力，改善仔猪生长性能和空肠养分消化吸收能力。

参考文献：

[1] TAN B,LI X G,KONG X F,et al.Dietary *L*-arginine supplementation enhances the immune status in early-weaned piglets[J].Amino Acids,2009,37(2):323–331.

[2] FAIRBROTHER J M,NADEAU E,GYLES C L.*Escherichia coli* in postweaning diarrhea in pigs:an update on bacterial types,pathogenesis,and prevention strategies[J].Animal Health Research Reviews,2005,6(1):17–39.

[3] FLECKENSTEIN J M,HARDWIDGE P R,MUNSON G P,et al.Molecular mechanisms of enterotoxigenic *Escherichia coli* infection[J].Microbes and Infection,2010,12(2):89–98.

[4] JIANG X R,ZHANG H,MANTOVANI G,et al.The effect of plant polyphenols on the antioxidant defence system of weaned piglets subjected to an *Escherichia coli* challenge[J].Journal of Animal and Feed Sciences,2014,23(4):324–330.

[5] 吕阳,张林,李雪妮,等.表达耐热肠毒素的重组大肠杆菌对 7 日龄仔猪肠道形态结构及抗氧化功能的影响[J].中国畜牧兽医,2017,44(9):2816–2821.

[6] RONG Y L,LU Z Q,ZHANG H W,et al.Effects of casein glycomacropeptide supplementation on growth performance,intestinal morphology,intestinal barrier permeability and inflammatory responses in *Escherichia coli* K88 challenged piglets[J].Animal Nutrition,2015,1(2):54–59.

[7] DAVIS M E,BROWN D C,BAKER A,et al.Effect of direct-fed microbial and antibiotic supplementation on gastrointestinal microflora,mucin histochemical characterization,and immune populations of weanling pigs[J].Livestock Science,2007,108(1/2/3):249–253.

[8] CHANG C Q,CHEN J D.Study on the protective mechanism of organic acids in human umbilical vein endothelial cells[J].Acta Nutrimenta Sinica,2004,26(4):280–283.

[9] KODALI V P,SEN R.Antioxidant and free radical scavenging activities of an exopolysaccharide from a probiotic bacterium[J].Biotechnology Journal,2008,3(2):245–251.

[10] BOTSOGLOU N A,FLOROU-PANERI P,CHRISTAKI E,et al.Effect of dietary oregano essential oil on performance of chickens and on iron-induced lipid oxidation of breast,thigh and abdominal fat tissues[J].British Poultry Science,2002,43(2):223–230.

[11] 田冬冬,刘志强,张颖,等.植物精油在养猪生产中的应用研究进展[J].湖南饲料,2015(1):33,36.

[12] KULISIC T,RADONIC A,KATALINIC V,et al.Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil[J].Food Chemistry,2004,85(4):633–640.

[13] BASMACIOĞLU-MALAYOGLU H,OZDEMIR P,BAĞRIYANIK H A.Influence of an organic acid blend and essential oil blend,individually or in combination,on growth performance,carcass parameters,apparent digestibility,intestinal microflora and intestinal morphology of broilers[J].British Poultry Science,2016,57(2):227–234.

[14] GIANNENAS I,DOUKAS D,KARAMOUTSIOS A,et al.Effects of *Enterococcus faecium*,mannan oligosaccharide,benzoic acid and their mixture on growth performance,intestinal microbiota,intestinal morphology and blood lymphocyte subpopulations of fattening pigs[J].Animal Feed Science & Technology,2016,220:159–167.

[15] YUAN L J,KANG S Y,WARD L A,et al.Antibody-secreting cell responses and protective immunity assessed in gnotobiotic pigs inoculated orally or intramuscularly with inactivated human rotavirus[J].Journal of Virology,1998,72(1):330–338.

[16] 廖波.25-OH-D_3对免疫应激断奶仔猪的生产性能、肠道免疫功能和机体免疫应答的影响[D].博士学位论文.雅安:四川农业大学,2011.

[17] LIVAK K J,SCHMITTGEN T D.Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method[J].Methods,2001,25(4):402–408.

[18] KIARIE E,BHANDARI S,SCOTT M,et al.Growth performance and gastrointestinal microbial ecology responses of piglets receiving *Saccharomyces cerevisiae* fermentation

products after an oral challenge with *Escherichia coli* (K88)[J].Journal of Animal Science,2011,89(4):1062–1078.

[19] BRZEK P,KONARZEWSKI M.Relationship between avian growth rate and immune response depends on food availability[J].Journal of Experimental Biology,2007,210(13):2361–2367.

[20] SHEN Y B,PIAO X,KIM S W,et al.The effects of berberine on the magnitude of the acute inflammatory response induced by *Escherichia coli* lipopolysaccharide in broiler chickens[J].Poultry Science,2010,89(1):13–19.

[21] MCLAMB B L,GIBSON A J,OVERMAN E L,et al.Early weaning stress in pigs impairs innate mucosal immune responses to enterotoxigenic *E.coli* challenge and exacerbates intestinal injury and clinical disease[J].PLoS One,2013,8(4):e59838.

[22] LIU Y,SONG M,CHE T M,et al.Dietary plant extracts alleviate diarrhea and alter immune responses of weaned pigs experimentally infected with a pathogenic *Escherichia coli*[J].Journal of Animal Science,2013,91(11):5294–5306.

[23] PAPATSIROS V G,TASSIS P D,TZIKA E D,et al.Effect of benzoic acid and combination of benzoic acid with a probiotic containing *Bacillus cereus* var.Toyoi in weaned pig nutrition[J].Polish Journal of Veterinary Sciences,2011,14(1):117–125.

[24] HUI D,PING Z,BING Y,et al.Effects of benzoic acid and Thymol on growth performance and gut characteristics of weaned piglets[J].Asian-Australasian Journal of Animal Sciences,2015,28(6):827–839.

[25] 李洁云,彭翔,张俊平,等.益生菌、酸化剂、精油、酶制剂的组合和抗生素对断奶仔猪生长性能和腹泻率影响的比较试验[J].中国饲料,2015(15):12–14,18.

[26] LYKKESFELDT J,SVENDSEN O.Oxidants and antioxidants in disease:Oxidative stress in farm animals[J].The Veterinary Journal,2007,173(3):502–511.

[27] NIELSEN F,MIKKELSEN B B,NIELSEN J B,et al.Plasma malondialdehyde as biomarker for oxidative stress:reference interval and effects of life-style factors[J].Clinical Chemistry,1997,43(7):1209–1214.

[28] 刁慧.苯甲酸和百里香酚对断奶仔猪生长性能和肠道健康的影响[D].硕士学位论文.雅安:四川农业大学,2013.

[29] 唐晓溪.迷迭香精油纳米乳制备及其抗氧化作用的研究[D].硕士学位论文.哈尔滨:东北林业大学,2009.

[30] CHENG Z B,LI D F,XING J J,et al.Oral administration of spermine advances intestinal maturation in sucking piglets[J].Animal Science,2007,82(5):621–626.

[31] JANG I S,KO Y H,KANG S Y,et al.Effect of a commercial essential oil on growth performance,digestive enzyme activity and intestinal microflora population in broiler chickens[J].Animal Feed Science and Technology,2007,134(3/4):304–315.

[32] 郭娟.肠道微生态对大鼠小肠刷状缘酶活性影响的研究[D].硕士学位论文.武汉:华中农业大学,2009.

[33] BREVES G,KOCK J,SCHRÖDER B.Transport of nutrients and electrolytes across the intestinal wall in pigs [J].Livestock Science,2007,109(1/2/3):4–13.

[34] DANIEL H.molecular and integrative physiology of intestinal peptide transport[J].Annual Review of Physiology,2004,66(1):361–384.

Effects of Compound Additive with Benzoic acid, *Bacillus* coagulans and Oregano Oil on Growth Performance, Antioxidant Capacity and Jejunal Digestion-Absorption Function of Piglets Challenged with Enterotoxigenic *Escherichia coli*

PU Junning[1] CHEN Daiwen[1] TIAN Gang[1] HE Jun[1] ZHENG Ping[1] MAO Xiangbing[1] YU Jie[1] HUANG Zhiqing[1] LUO Junqiu[1] LUO Yuheng[1] ZHU Ling[2] YU Bing[1*]

(1. *Key Laboratory for Animal Disease-Resistance Nutrition of Ministry of Education*, *Institute of Animal Nutrition*, *Sichuan Agricultural University*, *Ya' an* 625014, *China*; 2. *Animal Biotechnology Center of Sichuan Province*, *College of Veterinary Medicine*, *Sichuan Agricultural University*, *Chengdu* 610043, *China*)

Abstract: This experiment was conducted to investigate the effects of compound additive with benzoic acid, *Bacillus* coagulans and oregano oil on growth performance, antioxidant capacity, jejunal mucosa disaccharidase activities and nutrient transporter mRNA expressions of piglets challenged with enterotoxigenic *Escherichia coli*. Twenty (24±1)-day-old Duroc×Landrace×Yorkshire castration piglets with body weight of (7.64±0.46) kg were randomly assigned to four groups with five replicates per group and one pig per replicate. Piglets in control

*Corresponding author, professor, E-mail: ybingtian@163.com （责任编辑　武海龙）

group (CON group) and enterotoxigenic *Escherichia coli*-challenged group (ETEC group) were fed basal diets, and others in antibiotic group (AT group) and compound additives group (ABO group) were fed basal diets supplemented with antibiotics (20 g/t colistin sulfate+40g/t bacitracin zinc) and compound additives (3 000 g/t benzoic acid+400 g/t *Bacillus* coagulans+400 g/t oregano oil), respectively. On day 22, all piglets were orally infused with 3×10^{11}CFU *Escherichia coli*, except piglets in CON group, which were received the same dose of sterile essential medium. The experiment lasted for 26 days. The results showed that compared with CON group, the diarrhea rate and diarrhea index of piglets in ETEC group were significantly increased （$P<0.05$）, the content of malondialdehyde （MDA） in serum and jejunal mucosa was significantly increased （$P<0.05$）, the total antioxidant capability （T-AOC） and total superoxide dismutase（T-SOD） activity in serum and jejunal mucosa sodium-glucose cotransporter 1 （*SGLT*1） mRNA expression level were significantly decreased （$P<0.05$）, and tended to decrease the T-AOC and the T-SOD activity in jejunal mucosa （$P<0.10$）. Compared with ETEC group, the average daily gain （ADG） of piglets in ABO group was significantly increased （$P<0.05$）, the feed to gain ratio（F/G）of piglets was significantly decreased（$P<0.05$）, the diarrhea rate and diarrhea index of piglets were significantly decreased （$P<0.05$）, the content of MDA in serum and jejunal mucosa were significantly decreased （$P<0.05$）, the T-AOC and T-SOD activity in serum and jejunal mucosa were significantly increased （$P<0.05$）, the jejunal mucosa *SGLT*1 and oligopeptide transporter 1 (*PepT*1) mRNA expression level were significantly increased（$P<0.05$）. Furthermore, compared with AT group, the diarrhea index of piglets in ABO group was significantly decreased （$P<0.05$）, the serum T-AOC was significantly increased （$P<0.05$）. In conclusion, dietary supplemented with the compound additive with benzoic acid, *Bacillus* coagulans and oregano oil can relieve the diarrhea of piglets challenged with *Escherichia coli*, improve the antioxidant capacity of piglets, and improve growth performance and jejunal digestion-absorption function.

Key words: benzoic acid; *Bacillus* coagulans; oregano oil; growth performance; antioxidant capacity; weaned piglets